

Inkorporasi Kromium pada Khamir dan Kapang dengan Substrat Dasar Singkong yang Diberi Kromium Anorganik

W. D. Astuti^a, T. Sutardi^b, D. Evvyernie^b & T. Toharmat^b

^aPusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Jalan Raya Bogor Km 46, Cibinong
Telp: 021-8754587, E-mail: wulan_nie@yahoo.com

^bDepartemen Ilmu Nutrisi dan Taknologi Pakan, Fakultas Peternakan, IPB
Jl Agatis Kampus IPB, Darmaga, Bogor 16680
(Diterima 20-12-2005; disetujui 30-06-2006)

ABSTRACT

Organic-chromium (Cr) has higher availability for animals than inorganic-Cr sources. One of organic-Cr sources known is fungi contained high Cr. This organic-Cr was incorporated to fungi protein. Information about the best fungi or microorganisms used in organic-Cr production is still limited. The objective of this experiment was to study organic-Cr production using different kinds of fungi as Cr carrier. Organic-Cr production was conducted in a 4x3 factorial completely randomized experimental design with 3 replications. Four fungi used as carriers in organic-Cr production as the first factor were *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oryzae* and "ragi tape". The second factor was levels of Cr addition (500, 1000, 1500 mg/kg). Addition of 1000 mg Cr/kg substrate gave the highest Cr incorporation to fungi protein (484 mg/kg) and Cr incorporation efficiency (21.1%). The best fungi used as carrier in organic-Cr production was *Rhizopus oryzae* which gave the highest Cr incorporation (488 mg/kg) and incorporation efficiency (24.7%).

Key words : organic-Cr, production, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oryzae*, "ragi tape"

PENDAHULUAN

Kromium (Cr) merupakan mineral yang esensial bagi manusia maupun hewan, terutama dalam metabolisme karbohidrat dan lemak (Mertz, 1993; Anderson, 1993). Suplementasi mineral anorganik, termasuk Cr anorganik, yang selama ini umum digunakan ternyata mempunyai sifat yang merugikan. Mineral Cr dalam bentuk heksavalen (Cr⁶⁺) dapat menimbulkan toksisitas walaupun tingkat absorpsinya di usus tinggi, sedangkan bentuk

trivalen (Cr³⁺) yang tidak beracun sangat sulit diserap (Cefalu & Hu, 2004; McDowell, 1992). Batas maksimum toleransi konsentrasi Cr dalam ransum adalah 3000 mg/kg dalam bentuk oksida dan 1000 mg/kg dalam bentuk klorida (NRC, 2001). Beberapa kasus Cr anorganik yang dikonsumsi manusia melalui makanan sekitar 98% tidak diserap dan dikeluarkan melalui feses, sebaliknya ketersediaan Cr organik cukup tinggi yaitu 25-30% (Mordenti *et al.*, 1997). Dengan demikian, penggunaan mineral organik merupakan salah satu alternatif untuk

meningkatkan efisiensi dalam penggunaan mineral.

Pemberian Cr dalam bentuk organik akan memberikan efek positif karena lebih mudah diabsorpsi. Penelitian pada tikus menunjukkan bahwa Cr organik mempunyai *bioavailability* yang lebih baik dibandingkan Cr anorganik, sehingga lebih mudah diserap (Anderson *et al.*, 1996). Olin *et al.* (1994) menyatakan bahwa Cr nikotinat dapat diserap lebih baik dibandingkan Cr klorida. Kromium organik bisa dalam bentuk *Cr-chelate*, ragi berkadar Cr tinggi (high-Cr yeast) dan Cr-pikolinat. Pembentukan Cr organik dapat dilakukan dengan inkorporasi Cr ke dalam fungi. Hal tersebut dilakukan melalui proses biofermentasi yang menggunakan fungi sebagai produsen dengan substrat yang diperkaya dengan mineral Cr anorganik.

Proses biofermentasi tersebut sangat ditentukan oleh spesies fungi yang paling tepat untuk menghasilkan Cr organik. Selama ini sangat sedikit penelitian yang mempelajari spesies fungi yang dapat digunakan secara optimal sebagai *carrier* dalam produksi Cr organik. Berkaitan dengan hal tersebut, dalam penelitian ini dipelajari proses sintesis Cr organik dengan menggunakan beberapa spesies fungi, yaitu *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oryzae*, dan ragi tape.

Tujuan penelitian ini adalah mempelajari penggunaan beberapa spesies fungi sebagai *carrier* pada produksi Cr organik, dan menentukan taraf Cr yang optimal dalam proses inkorporasi Cr.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial 4x3 dengan 3 ulangan. Perlakuan terdiri atas dua faktor. Faktor pertama adalah fungi yang digunakan dalam pembuatan Cr organik yaitu *S. cerevisiae*,

A. oryzae, *R. oryzae*, dan ragi tape. Faktor kedua adalah taraf Cr anorganik ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) yang ditambahkan ke dalam substrat yang digunakan sebagai media tumbuh, yaitu 500, 1000 dan 1500 mg/kg substrat.

Produksi Cr organik dilakukan dengan cara menginkorporasikan Cr ke dalam fungi melalui proses fermentasi. Substrat dasar yang digunakan adalah singkong. Singkong diiris tipis, kemudian dicampur dengan larutan Cr anorganik, triptofan, medium selektif dan air sehingga campuran substrat tersebut mempunyai konsentrasi Cr sesuai dengan perlakuan. Triptofan yang digunakan sebanyak 600 mg/kg. Campuran substrat kemudian disterilkan menggunakan *pressure cooker* selama 20 menit pada suhu 110°C, 15 psi. Setelah dingin, substrat diratakan pada nampan plastik dan ditambahkan starter/inokulan untuk masing-masing perlakuan fungi yang digunakan. Bagian atas nampan plastik dibungkus dengan kertas, dan disusun dalam rak yang tertutup plastik, dalam ruangan tertutup. Hal tersebut dilakukan untuk menghindari terjadinya kontaminasi tetapi masih ada udara yang masuk. Inkubasi dilakukan selama 5 hari pada suhu ruang, kemudian produk dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 50°C. Setelah kering, produk dihaluskan sehingga berbentuk butiran halus dan siap digunakan.

Peubah yang diamati adalah inkorporasi Cr ke dalam protein masing-masing fungi yang digunakan sebagai *carrier*, dan efisiensi inkorporasinya. Perbedaan fungi yang digunakan dan taraf Cr anorganik yang ditambahkan akan menghasilkan inkorporasi Cr yang berbeda pula.

Inkorporasi Cr ke dalam protein fungi (Cr organik) diukur dengan menggunakan *atomic absorption spectrophotometer* (AAS) menurut metode Carry & Allaway (1971). Satu gram sampel Cr organik dimasukkan ke dalam tabung dan ditambahkan larutan TCA 20%. Tabung

disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Endapan yang dihasilkan ditimbang sebanyak 0,8 gram dan dimasukkan ke dalam labu destruksi lalu ditambahkan HNO₃ pekat sebanyak 10 ml. Labu dipanaskan sampai larutan mendidih selama 5 menit. Setelah dingin larutan ditambah 2 ml H₂SO₄ pekat, 2 ml HClO₄ 70%, dan 0,2 ml AgNO₃ 10% dan pemanasan kembali dilakukan sampai larutan menjadi jernih. Larutan jernih tersebut siap dibaca kadar Cr-nya dengan menggunakan AAS.

Efisiensi inkorporasi Cr ke dalam protein fungi didapatkan dengan membandingkan nilai Cr organik dengan nilai Cr total yang terdapat dalam sampel. Metode analisis Cr anorganik juga menggunakan metode Carry & Allaway (1971), tetapi protein sampel tidak diendapkan terlebih dahulu menggunakan TCA 20%.

Data yang diperoleh dari rancangan acak lengkap (RAL) dianalisis dengan menggunakan sidik ragam (analysis of variance) dan apabila ada perbedaan di antara perlakuan dilanjutkan dengan uji kontras orthogonal (Steel & Torrie, 1981).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kromium (Cr) organik terbentuk karena adanya inkorporasi Cr ke dalam sel fungi. Mineral organik tersebut merupakan mineral yang berasal dari proses “chelate” garam mineral yang terlarut dengan asam amino atau

protein yang terhidrolisis (Lyons, 1995). Hasil inkorporasi Cr organik ke dalam protein fungi dapat dilihat pada Tabel 1. Sebagai pembanding, dilakukan fermentasi substrat menggunakan empat jenis fungi tanpa penambahan Cr, kemudian dilakukan pengukuran kadar Cr organik. Kadar Cr organik dari fungi *S. cerevisiae*, *A. oryzae*, *R. oryzae* dan ragi tape yaitu sebesar 473, 413, 400, dan 537 mg/kg.

Inkorporasi Cr ke dalam protein fungi tidak dipengaruhi oleh taraf Cr yang digunakan maupun interaksinya dengan jenis-jenis fungi yang digunakan. Oleh karena itu, data yang diperoleh kemudian dianalisis secara deskriptif berdasarkan rata-rata. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan *R. oryzae* sebagai *carrier* menghasilkan rata-rata inkorporasi Cr organik yang tertinggi (488 mg/kg), diikuti oleh *A. oryzae* (459 mg/kg) dan ragi tape (430 mg/kg). Rataan inkorporasi Cr paling rendah dihasilkan oleh *S. cerevisiae* (370 mg/kg).

Pada produksi Cr organik yang menggunakan ragi tape dengan taraf Cr 500 mg/kg, dihasilkan Cr organik sebesar 610 mg/kg. Berarti Cr organik yang dihasilkan lebih besar daripada Cr yang ditambahkan pada proses pembuatannya. Hal tersebut menunjukkan bahwa sudah terdapat Cr di dalam mikroorganisme ragi tape, yang sesuai dengan data hasil pengukuran kadar Cr organik pada fermentasi substrat yang dilakukan tanpa penambahan Cr. Adanya Cr organik tanpa

Tabel 1. Inkorporasi Cr ke dalam protein fungi (mg/kg)

Fungi	Taraf Cr			Rataan
	500	1000	1500	
<i>S. cerevisiae</i>	257±22,03	553±15,69	300±80,01	370±19,78
<i>A. oryzae</i>	357±11,68	523±31,94	497±21,38	459±21,53
<i>R. oryzae</i>	447±30,05	497±23,46	520±32,14	488±25,13
Ragi tape	610±22,34	363±11,01	317±14,97	430±19,94
Rataan	418±23,48	484±20,25	408±20,82	437±21,22

dilakukan penambahan Cr sebelumnya menunjukkan bahwa ragi tape sudah mengandung Cr organik. Kadar Cr organik pada fermentasi substrat dengan ragi tape adalah 473 mg/kg. Konsentrasi Cr tersebut ikut berkembang bersama dengan perkembangan populasi mikroorganisme yang terjadi selama proses fermentasi pada produksi Cr organik.

Hasil analisis deskriptif menunjukkan bahwa berdasarkan rata-rata hasil yang diperoleh, kapang yang digunakan (*A. oryzae* dan *R. oryzae*) menghasilkan Cr organik lebih tinggi daripada khamir (*S. cerevisiae*). Penelitian Muktiani (2002) tentang inkorporasi Cr pada fungi menunjukkan bahwa inkorporasi Cr yang dihasilkan oleh *A. oryzae* lebih tinggi dibandingkan dengan *S. cerevisiae* (792,6 vs 636,2 mg/kg). Hal ini diduga berkaitan dengan substrat yang digunakan. Singkong yang digunakan sebagai substrat merupakan bahan sumber karbohidrat. Sementara kapang yang digunakan merupakan kapang pendegradasi protein. *A. oryzae* biasa dikenal sebagai kapang kecap, sedangkan *R. oryzae* merupakan kapang tempe. Penggunaan kapang pada substrat sumber karbohidrat menyebabkan proses pemanfaatan (metabolisme) Cr yang tinggi, karena Cr berhubungan dengan metabolisme karbohidrat. Inkorporasi Cr yang menggunakan ragi tape lebih tinggi daripada khamir *S. cerevisiae*, hal tersebut dapat disebabkan ragi tape merupakan campuran antara kapang dan khamir.

Mekanisme pengikatan dan metabolisme Cr oleh fungi ataupun mikroorganisme lain secara tepat belum dapat ditentukan. Walker (1998) menjelaskan bahwa penyerapan logam pada fungi terjadi melalui proses difusi pasif melewati dinding sel. Komponen sel yang berperan pada pengangkutan nutrisi selanjutnya adalah sitoplasma. Kromium yang masuk ke dalam sel fungi akan berikatan dengan protein fungi. Metode analisa Cr yang melalui

pengendapan protein dengan TCA menunjukkan bahwa Cr memang terikat pada protein fungi. Kemampuan fungi untuk memanfaatkan Cr mempunyai batas optimum, ditunjukkan dengan semakin menurunnya inkorporasi Cr ke dalam protein fungi pada taraf penambahan Cr yang semakin tinggi. Meskipun demikian, batas optimum Cr pada mikroorganisme belum diketahui. Sementara Zetic *et al.* (2001) menjelaskan bahwa trivalen Cr mempunyai kecenderungan untuk membentuk kompleks oktahedral dengan ligan pada membran sel. Absorpsi Cr oleh sel dipengaruhi oleh pH medium dan akumulasi Cr di permukaan sel.

Hasil analisis deskriptif berdasarkan rata-rata menunjukkan penggunaan Cr optimal yang menghasilkan inkorporasi Cr organik paling tinggi adalah 1000 mg/kg, sebesar 484 mg/kg. Penggunaan Cr sebesar 500 dan 1500 mg/kg menghasilkan inkorporasi Cr yang lebih rendah, yaitu 418 dan 408 mg/kg.

Pola inkorporasi Cr berbeda-beda pada setiap fungi yang digunakan. *S. cerevisiae* dan *A. oryzae* menghasilkan inkorporasi Cr yang optimal pada penggunaan Cr 1000 mg/kg. Penggunaan Cr yang lebih tinggi atau rendah justru menurunkan inkorporasi Cr pada protein fungi. *R. oryzae* menghasilkan inkorporasi Cr yang semakin tinggi dengan bertambahnya level Cr, sehingga inkorporasi Cr terbaik didapatkan pada penggunaan Cr 1500 mg/kg. Inkorporasi Cr tertinggi pada ragi tape justru didapatkan pada level Cr 500 mg/kg. Inkorporasi Cr pada ragi tape semakin menurun dengan bertambahnya level Cr.

Banyaknya Cr organik terdapat dalam protein fungi mencerminkan efisiensi inkorporasi Cr ke dalam protein fungi (Tabel 2.). Dibandingkan dengan fungi lain yang digunakan, ragi tape mempunyai efisiensi yang paling rendah. Level Cr yang berbeda tidak memberikan perbedaan yang signifikan,

Tabel 2. Efisiensi inkorporasi Cr ke dalam protein fungi (%)

Fungi	Taraf Cr (mg/kg)		
	500	1000	1500
<i>S. cerevisiae</i>	16,4±9,10 ^a	26,3±7,05 ^b	11,0±1,39 ^a
<i>A. oryzae</i>	17,8±3,61 ^a	23,8±15,74 ^b	22,9±15,32 ^b
<i>R. oryzae</i>	22,5±12,35 ^b	24,4±13,86 ^b	30,6±14,27 ^c
Ragi tape	22,6±7,53 ^b	9,7±3,98 ^a	6,5±2,37 ^a

Keterangan : superskrip berbeda menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$).

meskipun dari hasil yang didapat menunjukkan bahwa penambahan 1000 mg/kg Cr memberikan efisiensi yang paling tinggi yaitu sebesar 21,1%.

Efisiensi inkorporasi diperoleh dengan membandingkan Cr yang terinkorporasi pada protein fungi dengan Cr total pada sampel. Tidak semua Cr yang ditambahkan pada substrat dapat dimanfaatkan oleh fungi. Kromium yang tidak dimanfaatkan oleh fungi (tersisa) tetap tersedia pada substrat dan tidak terikat pada protein. Diduga proses pemanfaatan Cr oleh fungi dibatasi oleh populasi dan kebutuhan fungi terhadap Cr. Zetic *et al.* (2001) menjelaskan bahwa akumulasi Cr pada sel khamir terjadi pada fase eksponensial dari kurva pertumbuhan khamir tersebut. Hal itu menyebabkan tidak semua Cr dapat dimanfaatkan sehingga terdapat perbedaan antara konsentrasi Cr yang terikat pada protein (Cr organik) dengan Cr total.

Efisiensi inkorporasi menunjukkan pola yang serupa dengan inkorporasi Cr dalam protein fungi. Efisiensi tertinggi pada *S. cerevisiae* terjadi pada taraf Cr 1000 mg/kg. Peningkatan taraf Cr yang digunakan justru menurunkan efisiensi inkorporasi secara signifikan ($P < 0,05$), yang berarti inkorporasi tidak berlangsung secara optimal.

Pola yang sama terjadi pada *A. oryzae*, meskipun antara pemberian Cr 1000 mg/kg dan 1500 mg/kg tidak menunjukkan perbedaan yang

signifikan. Efisiensi inkorporasi Cr pada *R. oryzae* semakin meningkat dengan bertambahnya Cr yang digunakan. Efisiensi inkorporasi paling tinggi diperoleh pada pemberian Cr 1500 mg/kg yang berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan taraf pemberian Cr yang lebih rendah. Ragi tape menunjukkan pola inkorporasi yang terus menurun seiring dengan bertambahnya Cr yang digunakan.

KESIMPULAN

Fungi yang memberikan nilai inkorporasi Cr dan efisiensi terbaik adalah *R. oryzae*. Spesies kapang yang digunakan (*A. oryzae* dan *R. oryzae*) menghasilkan inkorporasi Cr organik dan efisiensi inkorporasi yang lebih tinggi daripada khamir (*S. cerevisiae*). Ragi tape yang merupakan campuran antara kapang dan khamir, menghasilkan inkorporasi Cr organik yang lebih tinggi daripada khamir, tetapi lebih rendah daripada kapang.

Inkorporasi Cr ke dalam protein fungi yang terbaik didapatkan pada penggunaan Cr 1000 mg/kg substrat yaitu sebesar 484 mg/kg, yang juga menghasilkan efisiensi inkorporasi Cr terbaik yaitu sebesar 21,1%.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, R.A.** 1993. Chromium, glucose tolerance, diabetes and lipid metabolism. *J. Adv. Med.* 8:37-49.

- Anderson, R.A., N.A. Bryden, M.M. Polansky & K. Gautschi.** 1996. Dietary chromium effects on tissue chromium concentration and chromium absorption in rats. *J. Trace Elem. Med.* 9:11-17.
- Cary, E.E. & W.H. Allaway.** 1971. Determination of chromium in plants and other biological materials. *J. Agric. Food Chem.* 19:1159-1167.
- Cefalu, W.T. & F.B. Hu.** 2004. Role of chromium in human health and in diabetes. *Diabetes Care* 11:2741-2751.
- Lyons, T.P.** 1995. Biotechnology in The Feed Industry: A look Forward and Backward. In: T.P. Lyons & K.A. Jacques (Eds.). *Biotechnology in The Feed Industry. Proc. of Alltech's 11th Annual Symposium.* Nottingham University Press:1-29.
- McDowell, L.R.** 1992. Minerals in Animal and Human Nutrition. Academic Press, Inc., San Diego, California.
- Mertz, W.** 1993. Chromium in human nutrition: a review. *J. Nutr.* 123:626-633.
- Mordenti, A., A. Piva & G. Piva.** 1997. The European perspective on organic chromium in animal nutrition. In: T.P. Lyons & K.A. Jacques (Eds.). *Biotechnology in The Feed Industry. Proc. of Alltech's 13th Annual Symposium.* Nottingham University Press:227-240.
- Muktiani, A.** 2002. Penggunaan hidrolisat bulu ayam dan sorghum serta suplemen kromium organik untuk meningkatkan produksi susu pada sapi perah. Disertasi. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- NRC (National Research Council).** 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th Ed. National Academic Press, Washington, D.C.
- Olin, K.L., D.M. Starnes, W.H. Armstrong & C.L. Kearn.** 1994. Comparative retention/absorption of ⁵¹Cr from ⁵¹Cr chloride, ⁵¹Cr nicotinate, and ⁵¹Cr picolinate in a rat model. *Trace Elements and Electrolytes* 11 : 182-191.
- Steel, R.G.D. & J.H. Torrie.** 1981. Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. 2nd Ed. McGraw Hill Kogashusha, Ltd., Tokyo.
- Walker, G.M.** 1998. Yeast Physiology and Biotechnology. John Wiley & Sons, Chichester, England.
- Zetic, V.G., V.S. Tomas, S. Grba, L. Lutilsky & D.Kozlek.** 2001. Chromium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* and isolation of glucose tolerance factor from yeast biomass. *J. Biosci.* 26:217-223.